



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

“EFECTO DE LA INSULINA SOBRE LA RAÍZ DE *Arabidopsis thaliana*”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:

Bibiana Ortega Domínguez

Asesora:

D.C. Elda Beltrán Peña

MORELIA, MICHOACÁN, MARZO 2007

A mi mamá y mis hermanos

Por todo el apoyo y amor incondicional que me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora

Por la paciencia y ayuda que me brindó para realizar mi tesis.

A mis sinodales:

Al Doc. Pardo

Por ser una gran guía para mí, por sus consejos y el cariño brindado.

Asdrúbal por ser un buen amigo y por sus consejos.

A Edith por la revisión de mi tesis.

Juan Carlos gracias por todo el apoyo que me brindaste y por tu ayuda con mi tesis.

A mis compañeros de laboratorio

Andrea, Poncho, Chucho, Asdrúbal, León, Liz, Denise, Pau, Alberto, Neto y Dulce por hacerme más agradable la estancia en el laboratorio.

Georgina gracias por compartir conmigo tus conocimientos y gracias por el apoyo.

A mi familia:

A mi mamá, a mi hermano Edgar, a mis hermanas Mara y Cyntia, mis sobrinos Ingrid, Ángel y la princesa por todo su amor.

A Gerard por estar a mi lado y apoyarme.

A mi mejor amiga Jenny por siempre estar a mi lado apoyarme y cuidarme.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DE LA D.C. ELDA BELTRÁN PEÑA.

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE LA UMSNH.

INDICE TEMÁTICO

Capítulo I. INTRODUCCIÓN.	10
 CÁPITULO II. ANTECEDENTES	 11
2.1 Insulina	11
- Funciones de la insulina	12
2.2 Ruta de transducción de señales PI3K activada por insulina y factores de crecimiento (IGF) disparada por la insulina	13
2.3 Antecedentes del efecto de insulina en plantas	16
2.4 Arabidopsis	18
2.4.1 Etapas de desarrollo de la planta de Arabidopsis	19
2.4.2 Embriogénesis	21
2.4.3 Arquitectura de la raíz	22
2.4.4 Zona meristemática o de división	24
2.4.5 Zona de elongación	25
2.4.6 Zona de diferenciación	26
- Pelos radicales	26
- Etapas de desarrollo para la formación de la raíces laterales	27
2.5 Hormonas vegetales	29
2.5.1 Auxina	30
2.6 Plantas transgénicas	32
 CÁPITULO III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	 34
3.1 Hipótesis	34
3.2 Objetivo general	34
3.3 Objetivos particulares	34

CÁPITULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1 Material	35
- Semillas utilizadas y condiciones de crecimiento	35
4.2 Métodos	35
4.2.1 Desinfestación de semillas de Arabidopsis	35
4.2.2 Preparación del medio de cultivo y condiciones de crecimiento	36
4.2.3 Cinéticas de crecimiento y número de raíces laterales de las plántulas de Arabidopsis	37
4.2.4 Aclaramiento de raíz	37
4.2.5 Primordios de raíces laterales	38
4.2.6 Desarrollo de los pelos radicales	38
4.2.7 División celular y la expresión de genes inducidos por auxina	38
4.2.8 Elongación de células epidermales	39
4.2.9 Análisis de datos	39
CÁPITULO V. RESULTADOS	40
5.1 Efecto de la insulina sobre el crecimiento de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
5.2 Crecimiento de la raíz e hipocótilo de plántulas de Arabidopsis en respuesta a insulina	43
5.3 Etapas de desarrollo de los primordios de raíces laterales en respuesta a diferentes concentraciones de insulina	45
5.4 Efecto de insulina sobre el desarrollo de pelos radicales	47
5.5 Efecto de insulina sobre la división celular y elongación	49

5.6 Efecto de insulina sobre sensibilidad a auxinas	51
CÁPITULO VI. DISCUSIÓN	53
CÁPITULO VII. CONCLUSIONES	56
CÁPITULO VIII. BIBLIOGRAFIA	57

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Secuencia de aminoácidos y estructura de la insulina humana	11
Figura 2. Ilustración esquemática de las principales acciones de la señalización de insulina.	13
Figura 3. Convergencia de la ruta mTOR que sensa nutrientes y energía con la ruta de transducción de señales PI3K activada por insulina y factores de crecimiento semejantes a insulina.	15
Tabla I. Proteínas encontradas en vertebrados y plantas, asociadas a la vía de señalización de insulina	18
Figura 4. Etapas de desarrollo de Arabidopsis	20
Figura 5. Representación esquemática del origen embrionario de la raíz de Arabidopsis	21
Figura 6. Zonas de la raíz principal de Arabidopsis	23
Figura 7. Cortes transversal y longitudinal de la raíz principal de Arabidopsis	25
Figura 8. Sección transversal de la raíz de Arabidopsis	27
Figura 9. Etapas de desarrollo del primordio de raíz lateral.	29

Tabla II. Funciones de las hormonas vegetales	30
Figura 10. Plantas transgénicas de CycB1:uidA y DR5:uidA.	33
Figura 11. Efecto de insulina sobre el crecimiento de Arabidopsis.	41
Figura 12. Efectos de insulina sobre la arquitectura de la raíz de Arabidopsis	42
Figura 13. Efecto de la oscuridad en el crecimiento de la raíz principal e hipocótilo	44
Figura 14. Efecto de insulina sobre el desarrollo de raíces laterales en Arabidopsis.	46
Figura 15. Efecto de insulina sobre los pelos radiculares	48
Figura 16. Efecto de insulina sobre la división y elongación celular	50
Figura 17. Sensibilidad a auxina	52

I. INTRODUCCIÓN

La insulina y péptidos parecidos a insulina se encuentran ampliamente distribuidos en organismos, que va desde procariontes como *Escherichia coli* y eucariontes unicelulares como *Tetrahymena*, en hongos y en cianobacterias, hasta eucariontes superiores.

La insulina en mamíferos regula los niveles de glucosa en sangre, suprime la gluconeogénesis hepática y promueve la síntesis de glucógeno y su almacenamiento en hígado y músculos; también esta involucrada en la síntesis de triglicéridos y lípidos y su almacenamiento en tejido adiposo. En plantas J.B. Collip y C. H. Best reportaron la presencia de sustancias parecidas a la insulina en: cebollas, hojas de lechuga, raíces de cebada y betabel. Investigaciones recientes han mostrado que las plantas poseen varias moléculas involucradas en la vía de señalización de insulina reportada en mamíferos.

La *Arabidopsis thaliana* es una de las plantas más usadas en investigación debido a que su genoma ha sido totalmente secuenciado; además es una planta pequeña que puede ser cultivada en espacios reducidos, tiene alta producción de semillas y se conocen una gran variedad de plantas mutantes y transgénicas. Debido a las características antes mencionadas, en el presente trabajo exploraremos el efecto de insulina sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

II. ANTECEDENTES

2.1 INSULINA

La insulina es una hormona de naturaleza proteica con un peso molecular aproximado de 6 kDa que en mamíferos es segregada por las células β de Langerhans del páncreas. La insulina está formada por 2 cadenas polipeptídicas: la A de 21 aminoácidos y la B constituida por 30 aminoácidos; dichas cadenas están conectadas por dos enlaces disulfuro. En la Fig. 1 se muestra de manera esquemática la estructura de la insulina. Las células capaces de responder a la insulina poseen un receptor en su superficie, el cual es una proteína transmembranal compuesta de dos cadenas polipeptídicas α y dos polipéptidos β (Karp., 1998).

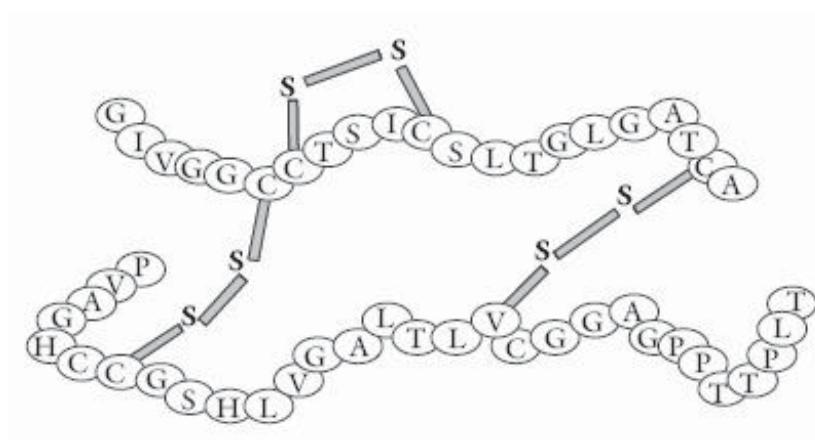


Figura 1. Secuencia de aminoácidos y estructura de la insulina humana (Morimoto, 2000)

FUNCIONES DE LA INSULINA

La insulina es ampliamente conocida por su papel en la regulación de glucosa en sangre, ésta suprime la gluconeogénesis hepática y promueve la síntesis de glucógeno y su almacenamiento en hígado y músculos. La insulina también está involucrada en la síntesis de triglicéridos y lípidos y su almacenamiento en tejido adiposo. Sin embargo, el sistema de señalización de insulina tiene un papel más amplio en la fisiología de mamíferos, debido a que dicha ruta de señalización está compartida con el factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-1). Durante el desarrollo de mamíferos, el sistema de señalización insulina-IGF promueve el crecimiento y la sobrevivencia de muchos tejidos, incluyendo las células β del páncreas, hueso y retina entre otras (White M.F., 2007).

Como se muestra en la Fig. 2 una de las funciones fundamentales de la insulina consiste en estimular la captura de glucosa hacia el interior de la célula, favoreciendo la translocación de los transportadores GLUT-4 a la membrana plasmática en músculo y tejido adiposo (Pessin et al., 2000 y Olson et al., 1996) y otra de las funciones importantes está comprendida en procesos de crecimiento.

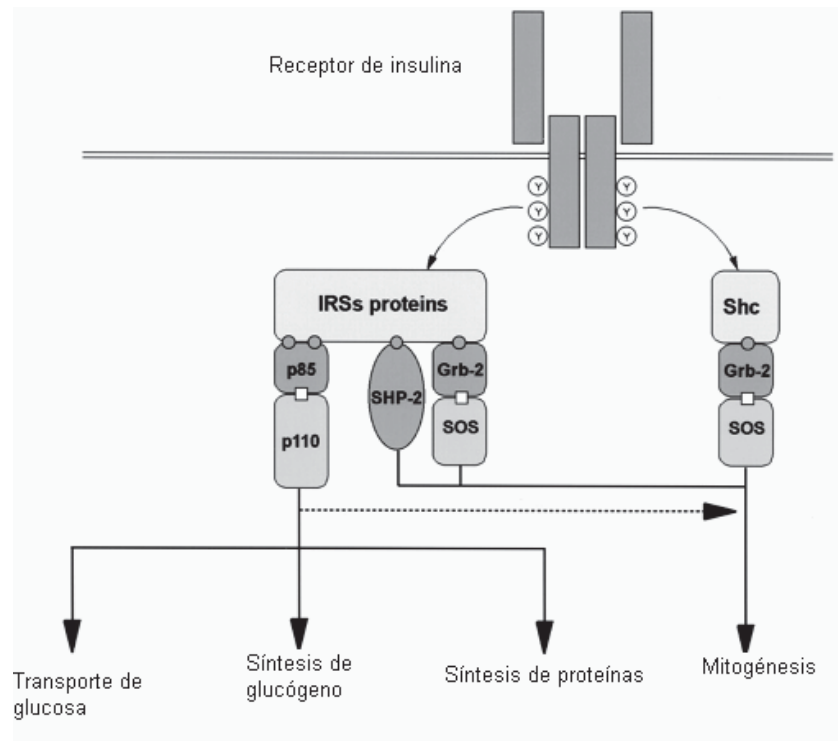


Figura 2. Ilustración esquemática de las principales acciones de la señalización de insulina. Unión del receptor de insulina fosforilado y las proteínas IRS fosforiladas y Shc, la cuales diferencian varias proteínas de señalización río abajo. PI3-K es importante para las acciones de insulina, tales como transporte de glucosa, síntesis de glucógeno y síntesis de proteínas, mientras que el complejo Grb-2/SOS activa la cascada de MAP cinasa, siendo importante en la respuesta mitogénica. PI3-cinasa modula probablemente la respuesta mitogénica también (Virkamäki et al., 1999).

2.2 RUTA DE TRANSDUCCION DE SEÑALES PI3K ACTIVADA POR INSULINA Y FACTORES DE CRECIMIENTO (IGF)

En la Fig. 3 se observa que el enlace de insulina o el IGF al receptor celular (IR), dispara el reclutamiento a la membrana y fosforilación del sustrato receptor de insulina (IRS), lo que genera un sitio de anclaje en la membrana para la PI3K (fosfatidil inositol 3-hidroxikinasa). La unión de PI3K al IRS permite que la cinasa fosforile al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) (fosfolípido de membrana) en la posición 3' OH produciendo el fosfatidilinositol 3, 4,5 trifosfato

(PIP3), el cual actúa como segundo mensajero. EL PIP3 entonces recluta en la membrana plasmática a las proteínas cinasas PDK 1 y PKB/Akt.

PDK 1 fosforila y activa a PKB/Akt y S6K (cinasa de la proteína ribosomal S6). Se ha sugerido que PKB/Akt media la activación de la cinasa mTOR, lo que incrementa la fosforilación de la proteína de enlace al factor de inicio de la traducción 4E (4EBP) y S6K (Manning and Cantley, 2003). Ambos eventos resultan en una regulación selectiva de la traducción, produciendo proteínas específicas requeridas por la célula para crecer y/o iniciar la división celular (Fumagalli S. and Thomas G., 2000). Sobre esta ruta actúan efectores negativos como la fosfatasa de fosfolípidos (PTEN) y el complejo de las proteínas de esclerosis tuberosa TSC1 (hamartina) y TSC2 (tuberina). El complejo TSC1/TSC2 junto con la proteína Rheb (homólogo de Ras, miembro de la superfamilia de proteínas que enlazan GTP), proporcionan un enlace entre la ruta PI3K (regulada por factores de crecimiento) y la ruta mTOR sensible a nutrientes (Manning and Cantley, 2003). El orden de los componentes en la vía mTOR de la ruta PI3K, se determinó con el uso de dos inhibidores Wortmanina (metabolito fungal) y rapamicina (macrólido bacterial). La wortmanina se enlaza directamente a la PI3K e inhibe su actividad, bloqueando la fosforilación de PKB, S6K y 4EBP. La rapamicina se une con alta afinidad a la inmunofilina FKBP, formando un complejo inhibidor que se enlaza al mTOR y bloquea la fosforilación de S6K y 4EBP (Brunn et al., 1996). Al fosforilar mTOR al 4EBP, libera al factor eIF4E del complejo inactivo eIF4E/4EBP y permite que la proteína eIF4E forme el complejo de iniciación

eIF4F (que consta además de las proteínas eIF4A y eIF4G). eIF4E es el factor limitante en el inicio de la traducción (Gingras et al., 2001).

La fosforilación de S6K activa a esta cinasa, la cual a su vez fosforila a la proteína ribosomal S6. Los ribosomas fosforilados en S6 traducen preferencialmente a los mRNAs que presentan trectos de oligopirimidinas en el extremo 5' UTR (TOP) (Meyuhas, 2000). Los transcritos con estas características codifican para componentes del aparato traduccional, principalmente las proteínas ribosomales.

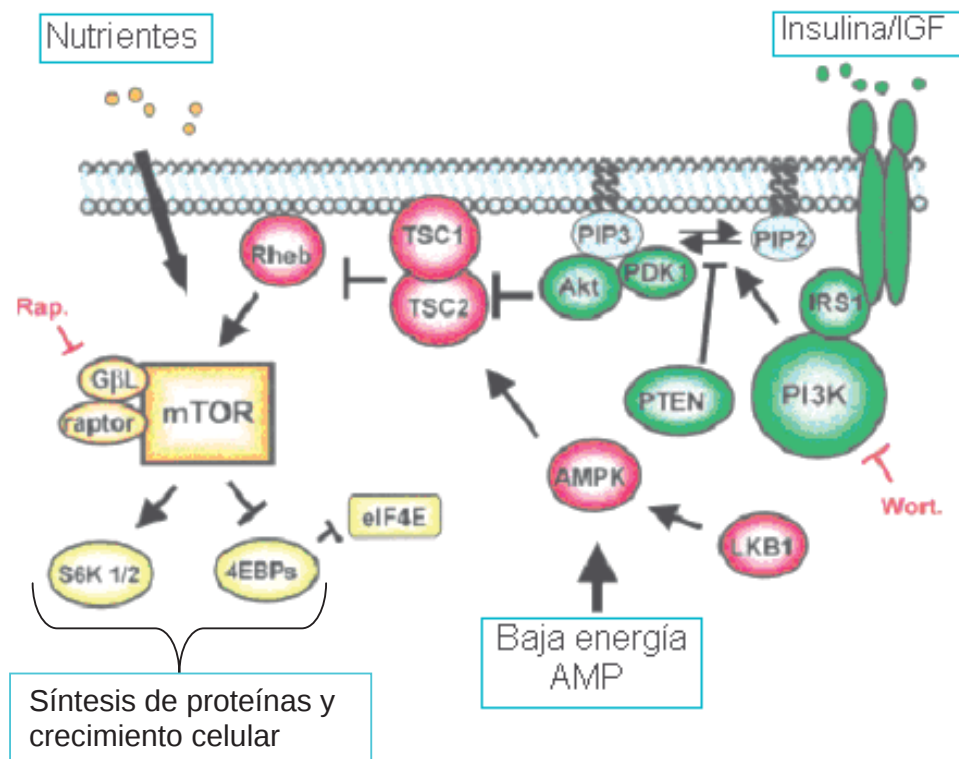


Figura 3. Convergencia de la ruta mTOR que sensa nutrientes y energía con la ruta de transducción de señales PI3K activada por insulina y factores de crecimiento semejantes a insulina. La activación de la ruta de mTOR por la ruta de PI3K ocurre por la vía de la fosforilación e inactivación de TSC2 por Akt. La inhibición de mTOR bajo condiciones de baja energía (cuando aumenta la relación AMP/ATP) ocurre a través de la fosforilación y activación de TSC2 por AMPK, la cual también es regulada por LKB1. La activación es indicada por la flecha, la inhibición por barras. Rap., rapamicina; Wort., Wortamina (Richardson et al., 2004).

2.3 ANTECEDENTES DEL EFECTO DE INSULINA EN PLANTAS

La insulina pancreática fue descubierta por Frederick Banting en 1921-1922 (Banting et al., 1922), después de este descubrimiento J.B. Collip y C. H. Best reportaron la presencia de sustancias parecidas a insulina en hojas de lechuga, raíces de cebada y de betabel. Collip estableció que: el descubrimiento de una hormona tanto en plantas como en levaduras de estructura similar a la producida en el páncreas, abriría nuevos campos de investigación en el metabolismo de plantas, y sugirió el nombre de glucocinina para esta hormona (Collip, 1923). En ese mismo año se reportaron sustancias parecidas a la insulina, las cuales estaban presentes en germinados de papa y arroz (Best and Scout, 1923).

M.M. Ellis y W.H. Eyster reportaron resultados de la acción de insulina y glucocinina sobre la germinación de maíz; ellos encontraron que altas concentraciones de insulina y glucocinina retardaban el crecimiento de las plantas en tanto que bajas concentraciones lo estimulaban. (Ellis and Eyster, 1923). Después de casi 65 años, Collier y su grupo publicaron que aislados proteícos de centeno etiolado, hojas de espinacas y *Lemna gibba* mostraron propiedades similares a la insulina de animales (Collier et al., 1987). Goodman y Davis en 1993 reportaron que al añadir insulina y factores de crecimiento parecidos a insulina, se aceleraba el desarrollo post germinativo de semillas de girasol, sandía y pepino (Goodman and Davies 1993).

En estudios más recientes Sánchez de Jiménez et al., en 1997 reportaron por acción de insulina el reclutamiento a polisomas del transcrito de la proteína ribosomal S6 y la fosforilación incrementada de esta última durante la germinación de maíz. En ese mismo año Beltrán-Peña reporto la presencia de dos peptidos de 24 kDa y 8 kDa en extractos de maíz germinados por 46 horas identificándolos por análisis en Western Blot. Sánchez de Jiménez y colaboradores encontraron que la adición de insulina en maíz (*Zea mays* L. cv. Chalqueño) aceleraba la germinación y crecimiento de plántulas, tales efectos se obtuvieron con 200µU/ml de insulina. Además a nivel molecular la insulina estimulaba la fosforilación de S6, aumentando con ello la síntesis de proteínas ribosomales en ejes embrionarios de maíz en germinación (Sánchez de Jiménez et al., 1999, Dinkova et al., 2000). Por otra parte Flores et al., en el 2001 reportaron el aislamiento de una proteína de 20 kDa de los ejes embrionarios de maíz, ellos mostraron que esta proteína exhibía actividad de IGF y su acción era similar a la que promueve la insulina bovina cuando es aplicada a ejes de maíz durante la germinación (Flores et al., 2001).

Ensayos en *Phaeolus vulgaris* (*P. vulgaris*) mostraron que concentraciones crecientes de insulina bovina promueven e incrementan la masa y tamaño de los epicótilos y raíces de *P. vulgaris* y también el número de raíces laterales (Santos, 2003). Como hemos mencionado anteriormente, en plantas se han encontrado algunos de los componentes de la ruta PI3-K disparada por insulina en mamíferos (Fig. 3); en la tabla I se muestran las moléculas de dicha ruta encontradas tanto en plantas como en animales (Filho et al., 2003).

Tabla I. Proteínas encontradas en vertebrados y plantas, asociadas a la vía de señalización de insulina (Filho et al., 2003).

PROTEÍNAS	ANIMALES	PLANTAS	REFERENCIAS
Insulina	+	+	Oliveira et al., 1999
Receptor de insulina	+	+	Carpi et al., 2002
Sustrato receptor de insulina IRS-1 y IRS-2	+	+	Dietrich et al., 1997
Fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K)	+	+	Hong et al., 1994; Bovet et al., 2001
TOR (Blanco de rapamicina)	+	+	Menand et al., 2002
Cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K)	+	+	Reyes de la Cruz et al., 2004

2.4 ARABIDOPSIS

Arabidopsis es una planta de la familia Brassicaceae., varias especies comprenden al género de Arabidopsis, siendo *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) la más conocida y usada extensamente en investigación. Arabidopsis se encuentra en todas las regiones de Europa, Asia y en el norte de África y ha sido introducida a otras áreas incluyendo Norteamérica y Australia. Las ventajas de usar Arabidopsis en investigación, es que su genoma es más pequeño que el de otras plantas y esta totalmente secuenciado. Dicho genoma esta constituido de 125 millones de bases y se predice que debe contener aproximadamente 25 000 genes, que no es poco si se compara con los genes que tiene la mosca de la fruta (13 600). Esta planta es fácil de cultivar, de rápido crecimiento, ya que completa su ciclo vital en 6 a 8 semanas, produciendo miles de semillas. Además se conocen más de 50 000 mutantes lo que facilita las investigaciones destinadas a individualizar los genes y conocer su función (Wilson, 2000).

2.4.1. ETAPAS DE DESARROLLO DE LA PLANTA DE ARABIDOPSIS

A los dos días de germinación se puede observar dos cotiledones que están sostenidos a un hipocótilo y una raíz primaria. El número de hojas en roseta producidas varían de cinco a más de treinta dependiendo del genotipo de la planta y condiciones de crecimiento (Fig. 4A). El crecimiento vegetativo de *Arabidopsis* consiste de una roseta de hojas de aproximadamente de 2-5 cm de diámetro y de un tallo de 20-70 cm como se observa en la Fig. 4B. Las flores de esta planta son de aproximadamente 3 mm de longitud y 1 mm de ancho y se producen en intervalos formando una inflorescencia o racimo. Las flores están formadas de cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres (cuatro largos y dos cortos), y un gineceo (Fig. 4C). Cada estambre se caracteriza por dos regiones: filamento y anteras. Exteriormente el gineceo está dividido dentro de tres regiones: ovario, estigma y estilo. El ovario consiste en dos carpelos que al madurar pueden ser vistos separados por un falso tabique (Fig. 3D).

La planta de *Arabidopsis* se fertiliza ella misma, produciendo vainas que están compuestas de dos carpelos separados por un falso tabique (Fig.3E); las vainas maduras y secas cambian de verdes a amarillas/café y las semillas son liberadas para permitir su distribución (Fig. 3F) (Wilson, 2000).

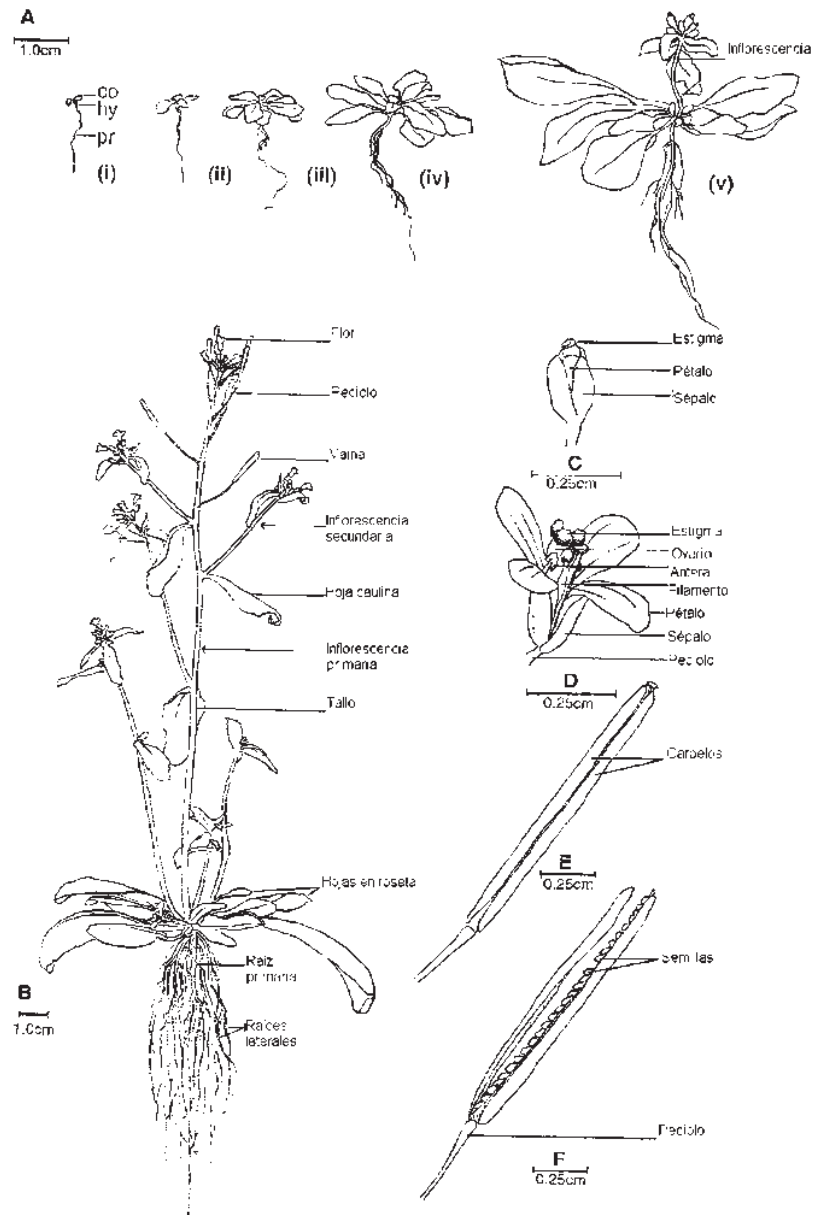


Figura 4. A. Etapas de desarrollo de *Arabidopsis*. Planta crecida a 25°C con un fotoperiodo de 20 horas de luz. Etapas (i) a (v) representan a la plántula crecida por 2 y 21 días después de germinar. La transición a la fase reproductiva de crecimiento (v) está caracterizada por elongación de los internodos en la inflorescencia. B. Planta madura de *Arabidopsis* a 35 días de germinada, aquí observamos los diferentes órganos que la conforman. C-F. Diagramas muestran con detalle la estructura de las flores y frutos de esta planta (Wilson, 2000).

2.4.2. EMBRIOGÉNESIS

Los eventos que toman lugar durante la embriogénesis y llevan a la formación de la planta han sido ampliamente descritos en *Arabidopsis thaliana* (Montiel et al., 2004). Durante el desarrollo embrionario, el cigoto experimenta una división asimétrica formando las células basal y apical (Fig. 5). La célula apical experimenta tres rondas de mitosis formando ocho células (proembrión). La capa superior del proembrión da origen al meristemo del brote y la mayor parte de los cotiledones, mientras que la capa basal contribuye a la formación de los cotiledones, hipocotilo y la mayor parte de la raíz. La división de la célula basal da lugar al suspensor, a la célula superior de dicho suspensor se le conoce como hipófisis. El centro quiescente y la columela que se localizan en la punta de la raíz, se originan a partir de la hipófisis.

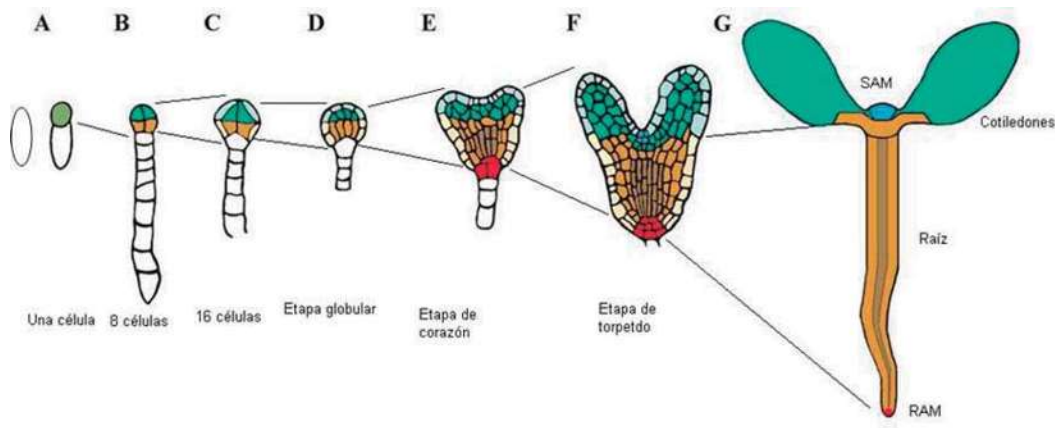


Figura 5. Representación esquemática del origen embrionario de la raíz de *Arabidopsis*. De izquierda a derecha: primeras divisiones del cigoto, etapa de ocho células; etapa globular; etapa de corazón, torpedo y plántula (Berleth T. and Chatfield S, 2002).

2.4.3 ARQUITECTURA DE LA RAÍZ

El estudio de la raíz de *Arabidopsis* ha contribuido al entendimiento de varios aspectos en el proceso de desarrollo vegetal. Esto es debido en gran parte a su invariable ontogenia y organización celular fija. La continúa diferenciación celular en la región meristemática de la raíz permite monitorear el desarrollo en los procesos después de la embriogénesis. La simplicidad en la organización celular de la raíz, junto con la disponibilidad de varias clases de mutantes y la identificación de genes han permitido el entendimiento en los procesos de desarrollo a nivel celular (Scheres and Wolkenfelt., 1998).

La raíz de la planta de *Arabidopsis* es un órgano relativamente sencillo que consiste de una raíz principal, pelos radicales y raíces laterales. Las raíces presentan una gran variedad de funciones biológicas como son: mantener la planta vertical y en ciertas especies constituye un órgano importante de almacenamiento de nutrientes (Montiel et al., 2004).

El crecimiento continuo de la raíz se da a través de la actividad proliferativa del meristemo apical de la raíz. En tanto que los procesos de diferenciación producen los diferentes tipos de tejidos y células presente en la raíz madura (López et al., 2004).

Así mismo, la raíz de *Arabidopsis* presenta una morfología característica que se divide en diferentes zonas: división celular, elongación celular, diferenciación celular y maduración celular (Fig.6) (Montiel et al., 2004).

El meristemo de la raíz provee de nuevas células, las cuales se añaden a las filas preexistentes extendiéndose hacia la raíz madura. Arriba del meristemo radicular se localiza la zona de elongación en la cual se añaden nuevas células en división (menos frecuente que en el meristemo) y después se expanden totalmente diferenciadas en la zona de maduración (Casson et al., 2003). Bajo condiciones ambientales favorables, la formación de pelos radicales ocurre en la zona de diferenciación de la raíz primaria (López et al., 2004).

A continuación describiremos con detalle la arquitectura de las diferentes partes de la raíz.

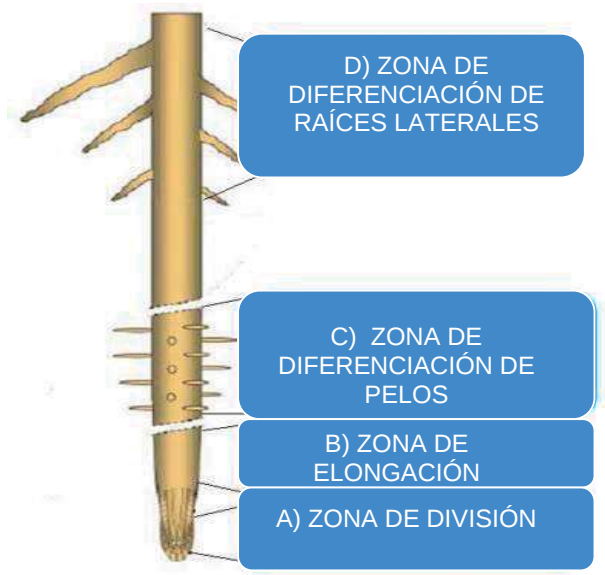


Figura 6. Zonas de la raíz principal de Arabidopsis. A) División, B) Elongación, C) Diferenciación de pelos D) Diferenciación de raíces laterales (Montiel *et al.*, 2004).

2.4.4 ZONA MERISTEMÁTICA O DE DIVISIÓN

Los tejidos de la raíz primaria de *Arabidopsis* se organizan en capas concéntricas; en la Fig. 7A el corte transversal de la raíz, muestra los anillos concéntricos de células que van del exterior al interior: epidermis, cortex, endodermis, periciclo y haz vascular; conteniendo este último las células vasculares internas. En la Fig. 7B se muestra un corte longitudinal en la zona meristemática de la raíz; observamos una región central de células mitoticamente inactivas llamado centro quiescente (QC), cuya función consiste en inhibir la diferenciación del grupo de células iniciales (Clowes, 1954). En *A. thaliana*, el QC está compuesto de cuatro células (Baum et al., 2002). En la fig. 7C se muestra que alrededor del centro quiescente se localizan las células iniciales que posteriormente darán origen a los siguientes tipos celulares: periciclo, tejido vascular, endodermis y cortex. En el lado distal del centro quiescente se encuentran las células de la columela y “lateral root cap” (Casson et al., 2003).

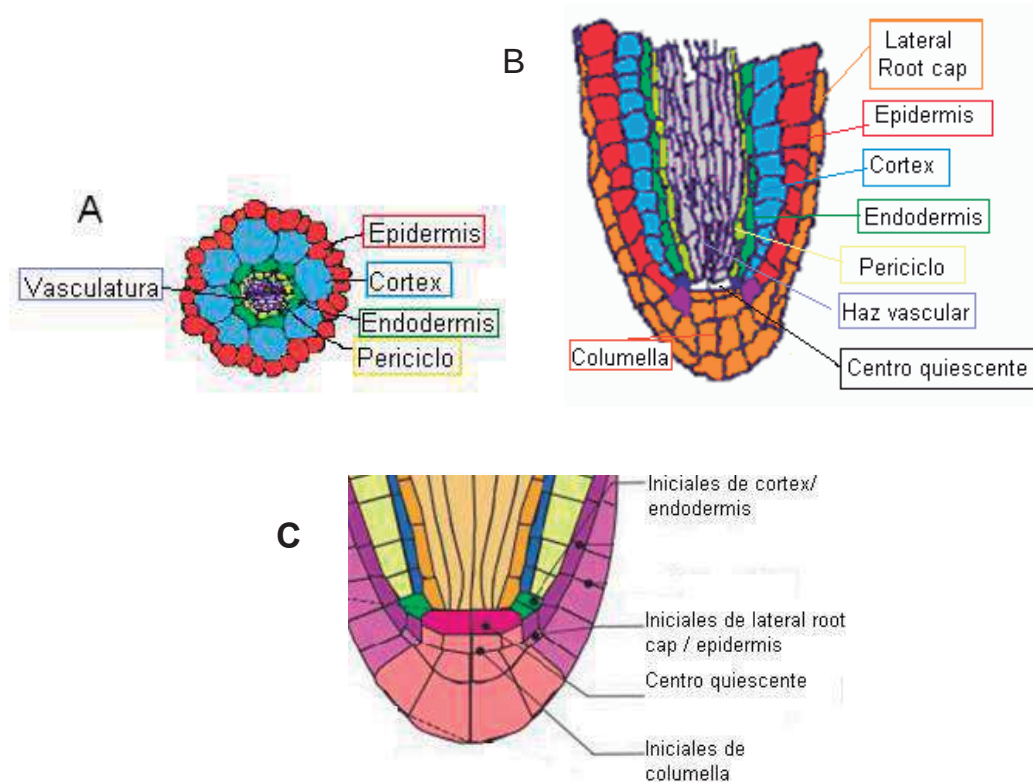


Figura 7. Corte transversal y longitudinal de la raíz principal de Arabidopsis. A) Corte transversal mostrando las capas concéntricas de la raíz. B) Corte longitudinal del meristemo de raíz. C) Ampliación de la zona meristemática de la raíz, donde se muestran las células que dan inicio a las diferentes capas que conforman a la raíz (Malamy et al., 1997, Scheres et al., 2002).

2.4.5 ZONA DE ELONGACIÓN

El meristemo de la raíz provee nuevas células, las cuales se añaden a filas pre-existentes que se extienden a la raíz madura. Arriba del meristemo de la raíz, llamada también zona de elongación se añaden las nuevas células formadas, las cuales se expanden totalmente para diferenciarse en la zona de maduración en varios tipos celulares de la raíz (Casson et al., 2003).

2.4.6 ZONA DE DIFERENCIACIÓN

En la zona de diferenciación se forman dos órganos importantes para la raíz: los pelos radiculares más próximos a la zona de elongación y las raíces laterales.

PELOS RADICULARES

Los pelos radiculares se presentan dependiendo de la especie y de factores ambientales (disponibilidad de nutrientes disponibles, pH del suelo y/o presencia de microorganismos) en la zona de diferenciación de la raíz primaria, (Fig. 6). Bajo condiciones ambientales favorables, la formación del pelo radicular toma lugar en la raíz en la zona de diferenciación y crecen a partir de la epidermis iniciando como una protuberancia tubular perpendicular a la superficie epidérmica (Montiel et al., 2004).

En *Arabidopsis*, los pelos radiculares son de aproximadamente 10 μm de diámetro y pueden crecer de 1 mm o más en longitud. Las funciones principales de los pelos radiculares consisten en: incrementar la superficie total de absorción en el sistema de raíz y participa en la distribución de nutrientes y agua e interactuando con microorganismos. En *Arabidopsis*, las células epidermales que producen pelos radicales (tricoblastos) están intercaladas entre células que carecen de pelos radicales (atricoblastos) (Fig. 8) (Grierson and Schiefelbein., 2002).

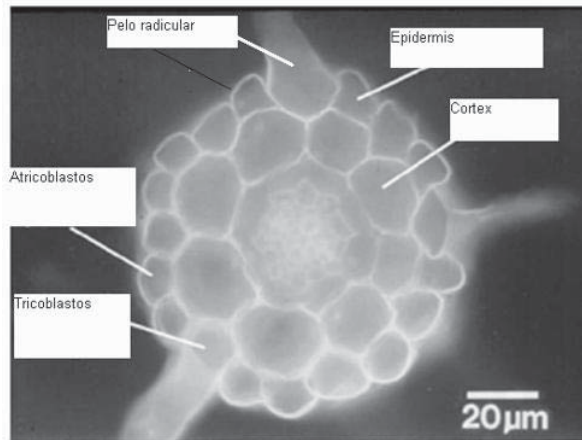


Figura 8. Sección transversal de la raíz de Arabidopsis. La figura muestra el patrón de células que producen pelos radiculares (tricoblastos) y atricoblastos. Tres pelos son visibles en este corte (Grierson and Schiefelbein., 2002)

ETAPAS DE DESARROLLO EN LA FORMACIÓN DE LAS RAÍCES LATERALES

Estudios histológicos han mostrado que en las angiospermas, las raíces laterales provienen del periciclo de la raíz principal. En algunas monocotiledóneas se ha encontrado también una contribución de las células endodermales, la iniciación de raíces laterales ocurre en la zona de diferenciación de la raíz (Fig. 6), donde las células del periciclo no están dividiéndose activamente. Las células maduras del periciclo, una vez estimuladas por las auxinas, se desdiferencian y proliferan formando un primordio de la raíz lateral (LRP). El LRP crece a través de las capas sobrepuestas de la célula de la raíz madre y eventualmente surge rompiendo la epidermis. Las células del periciclo que se convierten en las células fundadoras del LRP se localizan en los polos del xilema, es difícil predecir qué

células del periciclo serán las seleccionadas para la formación de las raíces laterales (Malamy et al., 1997).

Son cuatro las etapas en las que se ha dividido el desarrollo de los primordios de raíces laterales (Fig. 9).

Etapa A. La capa externa (OL) se divide periclinalmente, generando tres capas que constituyen al primordio OL1, OL2 e IL (capa interna) (Fig. 9A).

Etapa B. Una célula central en OL1 y OL2 se divide anticlinalmente para formar cuatro pequeñas células cuboides (Fig. 9B). Las células adyacente a estas dos células en el OL1 y OL2 también se dividen (Fig. 9B), creando una capa externa (OL1) que contiene de 10-12 células (Fig. 9B). En adición, las células en IL2 se amplían radialmente y dividen (observar la flecha corta, Fig. 9B), empujando las capas sobrepuestas para arriba y al parecer comprimiendo las células en IL1 y OL2.

Etapa C. En el primordio ampliado se hace más difícil caracterizar las divisiones, principalmente en las capas internas. En apariencia muchas de las células del LRP continúan experimentando divisiones anticlinales. (Fig. 9 C). Se muestra un patrón de 8-8-8 debido a que hay 8 células centrales y 8 células en cada lado.

Etapa D. El LRP emerge de la raíz principal (Fig. 9 D). (Malamy et al., 1997).

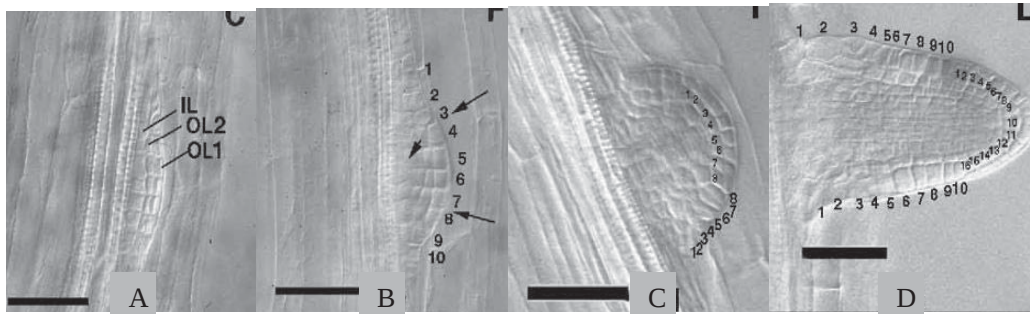


Figura 9. Etapas de desarrollo de los primordios de raíces laterales. A Una división periclinal en OL ha creado un total de tres capas. B. Las flechas indican dos divisiones anticlinales adicionales en OL1 y OL2. La flecha corta indica la región en la cual las células de la IL2 sufren expansión y división, distorsionando la forma de IL1 y OL2. Las células en la capa más externa son numeradas indicando la organización constante en esta etapa. C. Todas las células en la OL1 han experimentado divisiones anticlinales, como evidencia la forma de las células y el incremento en el número de células en esta capa. Esto da un patrón característico de células 8-8-8, como esta indicado por la numeración. D. La raíz lateral emerge totalmente. (Malamy et al., 1997).

2.5 HORMONAS VEGETALES

Las hormonas vegetales o fitohormonas son compuestos químicos especializados producidos por las plantas y son los principales factores internos que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Se han identificado cinco tipos de fitohormonas: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscisico y etileno y sus principales funciones se resumen en la tabla II:

Tabla II. Funciones de las hormonas vegetales.

Hormona	Función
Auxina	Promueve la formación de la radícula, el desarrollo de los tejidos vasculares, el control de la dominancia apical (aumento de masa dirigido por las yemas o puntas de tallos y raíces), actúa como una señal para la división, elongación y diferenciación celular durante el transcurso del ciclo de vida de la planta. La auxina natural es el IAA (ácido indol-3-acético) (Davies, 1995).
Citocininas	Promueven la división celular, iniciación y crecimiento del brote y modulan los niveles de etileno (Casson, 2003).
Etileno	Hormona involucrada en la germinación, maduración de fruto, abscisión de frutos, flores y hojas e inhibición de la elongación del tallo (Casson, 2003).
Giberelina	Hormona comprendida en la germinación de semillas y desarrollo de yemas; elongación de tallos; estímulo de la floración; desarrollo del fruto (Nemhauser et al., 2002).
Ácido abscisico	Regula la maduración del embrión, germinación, división celular y elongación y respuestas al estrés ambiental como el frío, ataque de patógenos y radiación UV (Finkelstein and Rock., 2002).

Una de las hormonas involucradas en el desarrollo de la raíz de las plantas y la cual describiremos con más detalle a continuación es la auxina:

2.5.1 AUXINA

El ácido indol-3-acético (IAA), es la auxina maestra del desarrollo de las plantas y es una de la hormonas más abundante en la naturaleza (Berger et al., 2000). El IAA se sintetiza a partir de triptofano, principalmente en las yemas

apicales foliares, de donde es transportado hacia el resto de la planta. Con el tiempo a quedado establecido que el IAA es un factor determinante en diversos procesos fisiológicos, entre los cuales se incluye: el desarrollo embrionario, la formación de la raíz principal y raíces secundarias, el desarrollo de los tejidos y órganos y las respuestas trópicas a luz y gravedad (Davies, 1995). A nivel celular, la auxina actúa como una señal para la división, elongación y diferenciación celular durante el transcurso del ciclo de vida de la planta (Abel and Theologis, 1996; Guilfoyle et al., 1998; Eckardt , 2001).

La auxina regula de forma rápida y específica la expresión de diversos genes (Hagen and Guilfoyle, 2002; Tiwari et al., 2003). La mayor parte de estos genes son inducidos de manera específica en tan solo 2-3 minutos después del tratamiento con la hormona, por lo que se conocen como “genes primarios de respuesta a auxina” (Liscum and Reed, 2002; Hagen and Guilfoyle, 2002; Tiwari et al., 2003). Por definición, la traducción de genes de respuesta primaria, es independiente de la síntesis de proteínas de *ново* (Liscum and Reed, 2002) y sus niveles de expresión son dependientes de la concentración de su inductor; esto implica que su activación transcripcional está mediada por componentes proteicos preexistentes que transmiten los estímulos extracelulares al núcleo celular.

El estudio de promotores de genes de respuesta primaria a auxina y la identificación de elementos reguladores en ellos, han dado como resultado herramientas experimentales para entender la señalización de la regulación por la auxina. Por ejemplo la línea celular DR5:GUS (consiste del promotor

sintético de respuesta a auxina DR5), se usa para analizar la respuesta a auxina y la describiremos a detalle más adelante.

2.6 PLANTAS TRANSGÉNICAS

Otro aspecto importante en el uso de *Arabidopsis* como sistema modelo es el gran número de plantas mutantes y transgénicas de las cuales se dispone.

En lo que se refiere a las plantas transgénicas, estas se obtienen transfiriendo a la planta una construcción formada por el promotor del gen de interés y un gen reportero. La expresión de los genes reporteros se determina evaluando su actividad bioquímica, inmunológica e histoquímica en los tejidos celulares. Uno de los genes reporteros más utilizados es el GUS (uid A); el gen GUS (β -glucoronidasa) se ha usado como un gen marcador para el análisis de la expresión de genes en plantas transformadas con él, debido a que presenta las siguientes ventajas: expresión estable y baja actividad intrínseca de GUS en la planta. Además, la enzima no interfiere con el metabolismo normal de la planta. (Kain et al., 1996)

La β -glucoronidasa hidroliza a su sustrato (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucoronido X-GlcA), produciendo un precipitado azul-índigo. En estudios histoquímicos se observan manchas azules en tejidos de plantas que están expresando GUS (Jefferson, 1989; Jefferson et al; 1987; Kosugi et al; 1990; Gallagher et al., 1992). Las plantas transgénicas que usaremos en el presente estudio son las DR5: uidA y Cyc B1:uidA que consisten en lo siguiente:

La planta Cyc B1:uid A tiene una construcción formada del promotor de ciclina mitótica B1 y el gen reportero GUS (Cyc B1:uid A) (Fig. 10 A). Debido a que el promotor pertenece a una proteína involucrada en el ciclo celular, esto nos permitió utilizar a dicha planta para observar la división celular en el meristemo radicular (Colon-Carmona et al., 1999).

En tanto que la línea DR5:uidA contiene un promotor sintético de respuesta a auxina unido a uidA lo que a permitido usar a dichas plantas para probar si el compuesto ensayado involucra la ruta de señalización de auxina (Fig. 10 B) (Ulmasov et al., 1999)

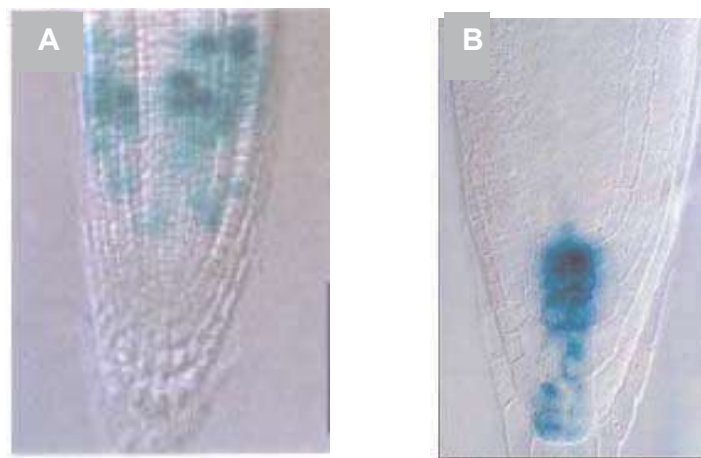


Figura 10. Plantas transgénicas de CycB1:uidA y DR5:uidA. A. Plántula Cyc:uidA donde se observan las células que se encuentran en división celular. B. Plántula DR5:uidA muestra el máximo de auxina en el inicio de la columella/región QC. (Ramírez et al., 2004; Scheres et al., 2002).

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPOTESIS

La insulina presenta un efecto sobre el crecimiento y arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana*.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de diferentes concentraciones de insulina sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*.

3.3 OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar la respuesta de *A. thaliana* a la insulina, evaluando el efecto sobre:

- ❖ Crecimiento de la raíz principal
- ❖ Crecimiento de la raíz principal e hipocótilo en plántulas crecidas en oscuridad
- ❖ Determinación del número de pelos radicales
- ❖ Número de raíces laterales
- ❖ Desarrollo de los primordios de las raíces laterales
- ❖ Determinación de la longitud de células epidermales
- ❖ División celular utilizando plantas transgénicas Cyc B1: uid A
- ❖ Sensibilidad a auxinas utilizando plantas transgénicas DR5:uidA

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material.

Semillas y reactivos utilizados

Se usaron semillas de plantas silvestres de Arabidopsis variedad Columbia-O (Col-O) y semillas de las líneas transgénicas de Arabidopsis DR5: uidA y CycB1: uidA.

Los siguientes reactivos fueron grado analítico y marca sigma: sales del medio Murashige and Skoog (MS); Tiamina, Piridoxina, Ácido nicotínico, Insulina porcina. Agar y sacarosa fueron marca Bioxon y 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-B-D-ácido glucuronido (X-Gluc) marca Phyto Technology Laboratories. Solución comercial de hipoclorito de sodio (cloralex) al 8% de cloro libre.

4.2 Métodos

4.2.1 Desinfestación de semillas de Arabidopsis

Las semillas se desinfestaron superficialmente de la siguiente forma: se añadió a las semillas 1 ml de agua estéril por 10 minutos con agitación ocasional; se eliminó el agua, y adiciono 1 ml de EtOH absoluto, se agitó perfectamente, centrifugó y eliminó el EtOH. Se agrego 1 ml de solución desinfectante (cloro 5%, Dodecil Sulfato de Sodio; SDS 1%), se agito constantemente por 5 min., centrifugó y se eliminó la solución. Después de 7 lavados con agua destilada estéril, se incubaron en 1 ml de agua estéril por 2 días a 4°C antes de sembrarlo.

4.2.2 Preparación del medio de cultivo y condiciones de crecimiento.

Para llevar a cabo todos los experimentos se utilizó el medio MS 0.2X, 2% de sacarosa y diferentes concentraciones de insulina: 0, 20, 200 y 2000 μ U/ml, el cual se preparó en la siguiente forma:

Se disolvieron 20 g de sacarosa y 0.86 g de sales MS en 1 lt de agua destilada; se ajustó el pH a 5.7 con una solución de KOH 1M. Antes de esterilizar se agregó 10 g de agar al medio. Se esterilizó por 21 minutos a 121°C. Después de esterilizado, al medio tibio se agregó 200 μ l/lt de una solución stock de vitaminas MF (Tiamina 1 mg/ml, Piridoxina 5mg/ml y Acido nicotínico 5 mg/ml, esterilizada por filtración) y la insulina (solución stock de 1405 μ U/ml esterilizada por filtración) se agregó en una cantidad adecuada para obtener la concentración deseada para cada tratamiento.

Después de desinfestadas las semillas se sembraron en cajas de petri con medio MS 0.2X, 2% de sacarosa y 1% de agar, y suplementado con diferentes concentraciones de insulina (20, 200 y 2000 μ U/ml). Las cajas se incubaron en forma vertical para que la raíz de las plántulas crecieran sobre el medio, en una cámara con fotoperiodo de 16h de luz y 8 h oscuridad, y una temperatura de 22°C a 25°C, con excepción de las plántulas etioladas (incubadas en oscuridad total).

4.2.3 Cinéticas de crecimiento y número de raíces laterales de las plántulas de Arabidopsis

Se sembraron semillas de *A. thaliana* en medio MS 0.2X, 2% de sacarosa y las diferentes concentraciones de insulina, para hacer dos análisis: el primero consistió en tomar datos para la cinética de crecimiento de la raíz principal de las plántulas durante 9 días haciendo una medición diaria en su longitud y en el segundo análisis se contaron el número de raíces laterales a los 8 días de crecimiento.

4.2.4 Aclaramiento de la raíz

Para el aclarado y montaje de las raíces para la visualización de las mismas, se llevó a cabo la metodología empleada por Malamy and Benfey (1997): se colocaron las plántulas de *Arabidopsis* en una solución ácida (0.24N HCl y 20% MeOH) incubándolas a 60°C durante 80 minutos, después se decantó la solución y se añadió solución básica (NaOH 7% y EtOH 60%) incubando a temperatura ambiente por 40 minutos, se decantó la solución y se añadió etanol a diferentes concentraciones (40,20,10%); donde se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, el material vegetal se incubó en etanol al 10% y glicerol al 50 %, toda la noche. Las plántulas se montaron en portaobjetos, con adición de glicerol hasta cubrir la plántula, se colocó el cubreobjetos y se sellaron las preparaciones con barniz. Se observaron al microscopio con objetivo de 10X.

4.2.5 Primordios de raíces laterales

Para observar las etapas de los primordios de raíces laterales se sembraron semillas de *Arabidopsis* en medio sólido MS 0.2X durante 8 días, transcurrido este tiempo se aclararon las raíces como se mencionó anteriormente y se montaron las plántulas en glicerol. Las observaciones se hicieron al microscopio con un objetivo de 10X y se determinaron las diferentes etapas de los primordios de raíz lateral según el método de Zhang et al. (1999).

4.2.6 Desarrollo de los pelos radiculares

Plántulas de 8 días de crecidas se observaron en un estereoscopio determinándose el tamaño y número de pelos radiculares, las imágenes se captaron por medio de una cámara adaptada al microscopio donde se tomaron fotografías con un objetivo de 0.8X.

4.2.7 División celular y expresión de genes inducidos por auxina

El análisis histológico las plántulas transgénicas Cyc B1: uid A y DR5: uid A, se realizó después de 9 días de sembradas en los diferentes medios de cultivo. Las plántulas se incubaron con el sustrato de GUS (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-B-D-Glucuronico X-Gluc) toda la noche a 37°C. Al final de la incubación las plántulas fueron aclaradas con el método antes mencionado y se hicieron las observaciones microscópicas.

4.2.8. Elongación de células epidérmicas

Para realizar el análisis sobre la elongación celular de la raíz primaria, se crecieron plántulas silvestres Col-O durante 8 días, las cuales fueron aclaradas y montadas en un portaobjetos con glicerol. Estas plántulas fueron observadas con objetivo 20X de un microscopio adaptado a una cámara donde se tomaron fotografías de la zona de elongación de la raíz principal.

4.2.9 Análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces de manera independiente tomando como muestra representativa 15 plántulas por tratamiento. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis estadístico, con el programa Statistica 6.0 que determina si los valores son estadísticamente representativos, utilizando el ANOVA y análisis post hoc de Tukey`s.

V. RESULTADOS

5.1 EFECTO DE LA INSULINA SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ DE *Arabidopsis thaliana*

Analizamos el efecto de insulina en el desarrollo y crecimiento de la raíz principal de plántulas de *Arabidopsis* (Col-0), para lo cual sembramos semillas en medio MS 0.2 X, 2% de sacarosa suplementado con diferentes concentraciones de insulina. Después de 9 días de crecimiento los resultados obtenidos mostraron (Fig. 11) que la insulina a bajas concentraciones (20 y 200 $\mu\text{U/ml}$) estimuló un ligero incremento en el crecimiento de la raíz principal respecto al control, no hubo diferencias en cuanto al número de raíces laterales pero si fueron más largas respecto al control. Mientras que a la concentración de 2000 $\mu\text{U/ml}$ presento una inhibición muy marcada en la longitud de raíz principal y mayor número y alargamiento de raíces laterales.

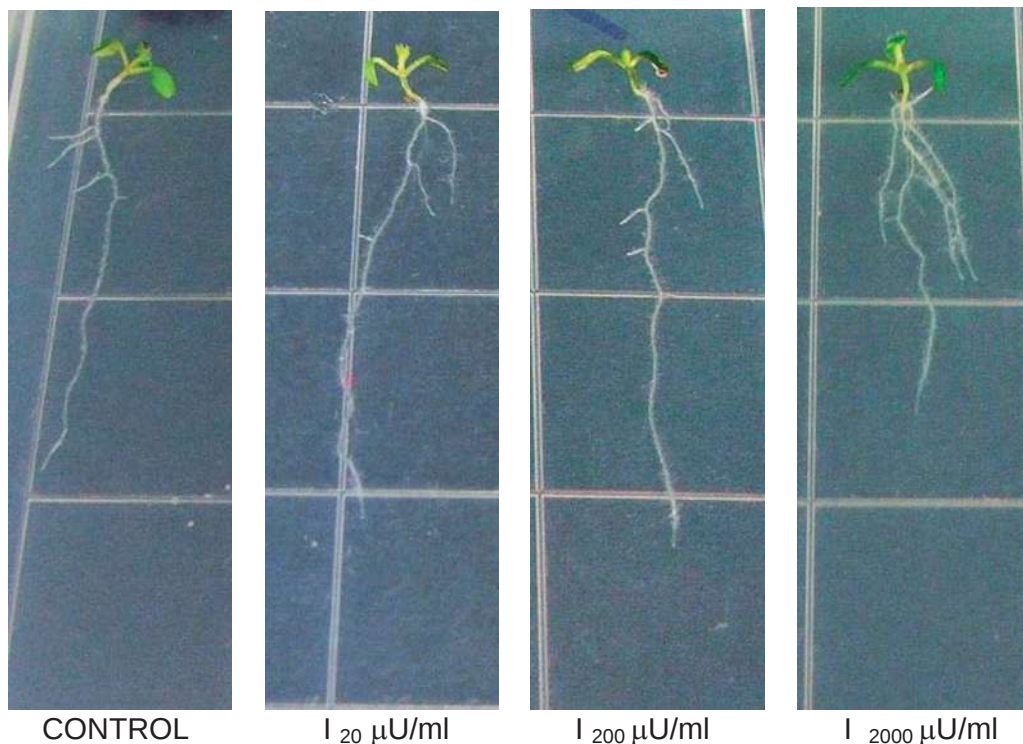
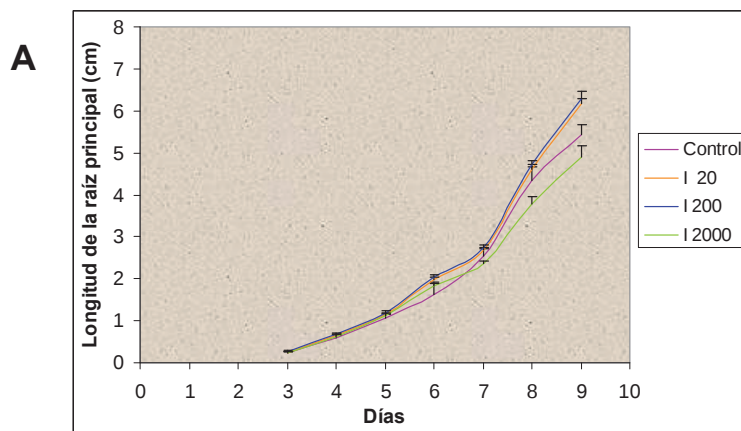


Figura 11. Efecto de insulina sobre el crecimiento de Arabidopsis. Plántulas de 9 días sembradas en medio MS 0.2X, suplementado con diferentes concentraciones de insulina: 0, 20, 200 y 2000 $\mu\text{U/ml}$.

En la Fig. 12A se muestra la cinética de crecimiento de la raíz principal: como puede observarse en los primeros días no se presenta variaciones considerables entre los diferentes tratamientos de insulina. Mientras que a partir del día ocho en adelante se observan variaciones entre los diferentes tratamientos. En la Fig. 12B se muestra la longitud de la raíz principal a los nueve días de crecimiento: observándose que las concentraciones de insulina de 20 y 200 $\mu\text{U/ml}$ estimulan ligeramente la longitud de la raíz primaria, mientras que a 2000 $\mu\text{U/ml}$ hay una inhibición, aunque estos no son cambios estadísticamente significativos ($P>0.05$). En lo que se refiere al efecto de insulina sobre el número de raíces laterales la Fig. C muestra que en la concentración inhibitoria de la raíz principal (200 $\mu\text{U/ml}$) hay un aumento en el número de raíces.



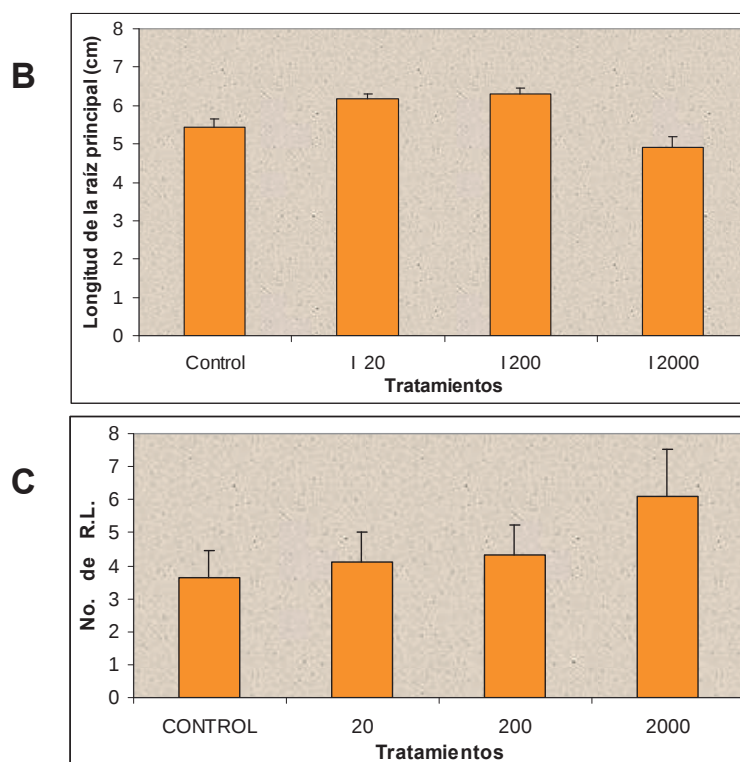


Figura 12. Efectos de insulina sobre la arquitectura de la raíz de Arabidopsis. Plántulas de Arabidopsis de 9 días crecidas en medio MS 0.2X y 2% de sacarosa suplementado con insulina: 0, 20, 200 y 2000 μ U/ml. A) Cinética de crecimiento de la raíz principal B) Longitud de la raíz principal. C) Número de raíces laterales. Los valores promedio obtenidos de al menos 15 plántulas ($\pm$ EE). ($P < 0.05$).

5.2 CRECIMIENTO DE LA RAÍZ E HIPOCOTILO DE PLÁNTULAS DE ARABIDOPSIS EN RESPUESTA A INSULINA

El desarrollo de las plántulas depende de las condiciones de oscuridad o luz; en luz la planta presenta cotiledones bien desarrollados, un pequeño hipocótilo y raíz larga; en tanto que en oscuridad muestra cotiledones poco desarrollados, hipocótilo largo y raíz pequeña. Este fenotipo se debe a que en oscuridad el crecimiento está sustentado por la expansión y división de células

embrionarias del hipocótilo, en tanto que el crecimiento en las plántulas en luz está dado por división celular a partir del meristemo apical de raíz (Garrett et al., 2005). Para inferir si el aumento en el crecimiento de la raíz principal a 20 y 200 $\mu\text{U/ml}$ de insulina se debía a procesos de división o elongación se realizó un experimento en condiciones de oscuridad, para el cual se sembraron 10 cajas con 6 semillas de *Arabidopsis* Col-0 en medio MS 0.2X, 2% de sacarosa suplementadas con diferentes concentraciones de insulina. A los 11 días de crecimiento la Fig. 13 muestra que el tratamiento 200 $\mu\text{U/ml}$ de insulina promueve significativamente el crecimiento de la raíz principal respecto al control. Estos datos sugieren que en el aumento en el crecimiento de la raíz principal a 200 $\mu\text{U/ml}$ esta involucrado el proceso de expansión celular.

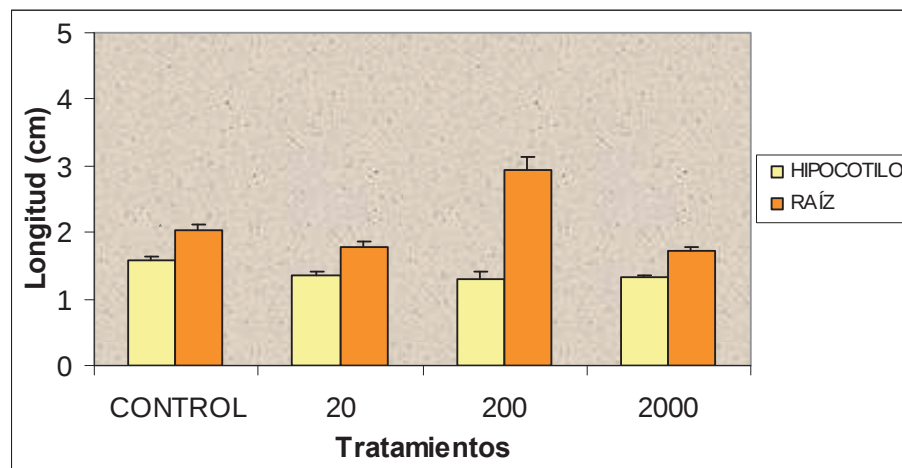


Figura 13. Efecto de la oscuridad en el crecimiento de la raíz principal e hipocótilo en plántulas de *Arabidopsis* de 11 días de edad. Semillas desinfestadas se sembraron en medio MS suplementado con insulina: 0, 20, 200 y 2000 $\mu\text{U/ml}$. ($P < 0.05$). $\pm$ EE

5.3 ETAPAS DE DESARROLLO DE LOS PRIMORDIOS DE RAÍCES LATERALES EN RESPUESTA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INSULINA

El aumento en el número de raíces laterales debido a 2000 $\mu\text{U/ml}$ de insulina (Fig. 12 C), puede deberse a: el crecimiento de los brotes ya existentes o la formación de nuevos primordios. Para conocer el origen de este cambio se tomaron plántulas representativas de 8 días de edad de crecidas en medios con diferentes concentraciones de insulina, se aclararon, se observaron en el microscopio a 40X para cuantificar las etapas de desarrollo en que se encontraban los primordios. Las etapas de desarrollo fueron clasificadas de acuerdo con lo reportado por Zhang et al. (1999). Los resultados mostrados en la Fig. 14 A, indican que la insulina a cualquier concentración promueve la etapa A en el desarrollo de los primordios de las raíces laterales siendo este

fenómeno más significativo a 200 μ U/ml. El incremento de primordios en la etapa A inducida por la insulina sugiere que dicha hormona en plantas esta promoviendo la formación de nuevos primordios de raíces laterales. En lo que se refiere a la densidad de los primordios la cual se obtuvo dividiendo el número de primordios entre la longitud de la raíz principal, la Fig. 14B muestra una mayor densidad de PRL en el medio suplementado con insulina a 2000 μ U/ml, lo que indica que solo a esta concentración de insulina los primordios formados de *ново* lograron desarrollarse.

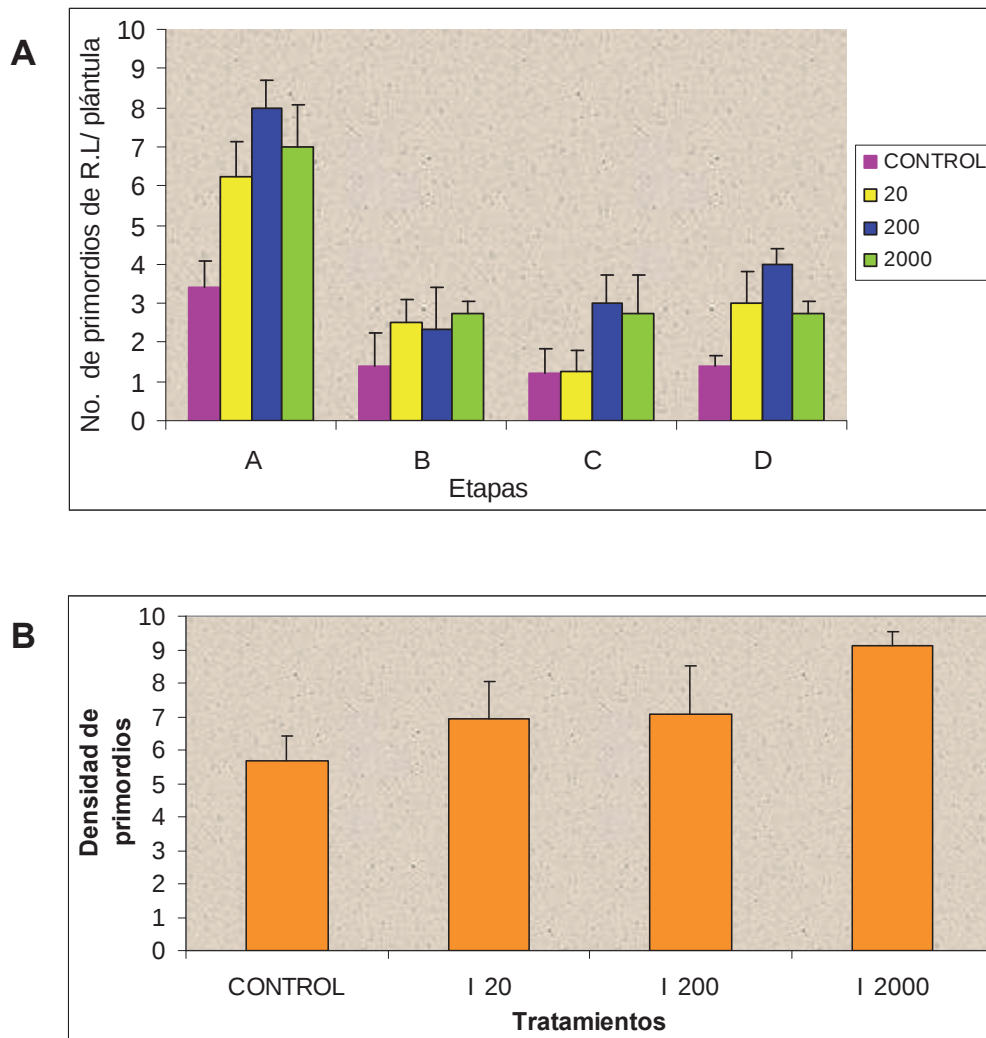


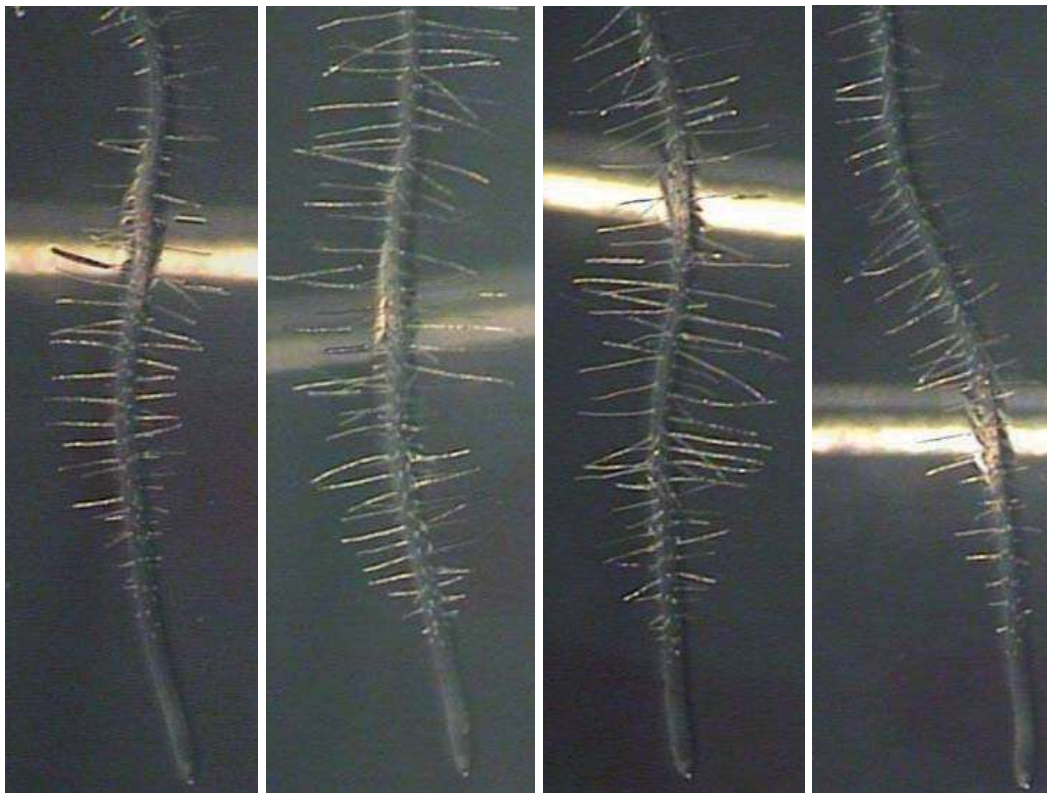
Figura 14. Efecto de insulina sobre el desarrollo de raíces laterales en Arabidopsis. A) Etapas de desarrollo de raíces laterales B) Densidad de raíces laterales. Plántulas de Arabidopsis de 8 días de edad crecidas en medio MS 0.2X, 2% de sacarosa adicionado con insulina: 0, 20,

200 y 2000 $\mu\text{U}/\text{m}$, donde se determinó el número de primordios de las diferentes etapas de desarrollo según con lo reportado por Zhang et al., (1999) en 15 plántulas representativas. Objetivo 40 X. Estos análisis fueron repetidos en dos ocasiones con resultados similares. ($P < 0.05$).

5.4 EFECTO DE INSULINA SOBRE EL DESARROLLO DE PELOS RADICULARES

Las funciones principales de los pelos radiculares consisten en: incrementar la superficie total de absorción en el sistema de raíz y participa en la distribución de nutrientes y agua (Grierson y Schiefelbein., 2002). Para observar si la insulina afectó el desarrollo de pelos radiculares se sembraron cinco cajas de medio MS 0.2X, 2% de sacarosa suplementado con las diferentes concentraciones de insulina. A los 6 días de sembradas se observaron en un estereoscópio los pelos radiculares presentes en la zona de diferenciación de la raíz primaria.

La Fig. 15 muestra que la insulina a concentraciones de 20 y 200 $\mu\text{U}/\text{ml}$ estimula la longitud de los pelos radiculares mientras que a 2000 $\mu\text{U}/\text{ml}$ los inhibe respecto al control.



CONTROL

I 20 $\mu\text{U/ml}$

I 200 $\mu\text{U/ml}$

I 2000 $\mu\text{U/ml}$

Figura 15. Efecto de insulina sobre los pelos radiculares. Plántulas de 8 días de sembradas en medio MS 0.2X, 2% de sacarosa con insulina en las siguientes concentraciones: 0, 20, 200 y 2000 $\mu\text{U/ml}$. Muestra representativa de una población de 15 plántulas. Objetivo 0.8 X.

5.5 EFECTO DE INSULINA SOBRE LA DIVISIÓN CELULAR Y ELONGACIÓN

El crecimiento de un organismo depende de dos procesos: elongación y/o división celular. Para tratar de determinar si la alteración en la longitud de la raíz primaria en respuesta a los tratamientos con insulina son debidos a que se están elongando las células o hay una mayor división celular, analizamos la expresión del meristemo radicular en plántulas transgénicas Cyc B1: uid A de 9 días de edad con los diferentes tratamientos de insulina. El análisis del gen reportero CycB1:uidA (Fig. 16A) mostró un aumento en la división, principalmente en 20 μ U/ml donde la longitud de la raíz principal también se incrementaba (Fig. 12A-B). En tanto, en la concentración de 2000 μ U/ml hay menor división pero este fenómeno no correlaciona con un cambio en la morfología del meristemo de raíz como se ha reportado, en plantas con disminución en la división celular (), lo cual solo indica que el crecimiento en la longitud de la raíz principal se debe a una estimulación en la división celular, pero tendríamos que emplear otras estrategias experimentales para confirmar dicho resultado. Para valorar la participación de la elongación en el crecimiento de la raíz principal por acción de la insulina, se midió el tamaño de las células de la epidermis, en la zona de diferenciación en plántulas de 8 días de edad; se observó en todas las concentraciones de insulina una disminución en el tamaño de las células epidérmicas respecto el control y en la concentración de 20 μ U/ml presentó una mayor disminución en el tamaño de las células epidérmicas(Fig. 16 B). Estos datos indican que la elongación celular no participa en los efectos de insulina.

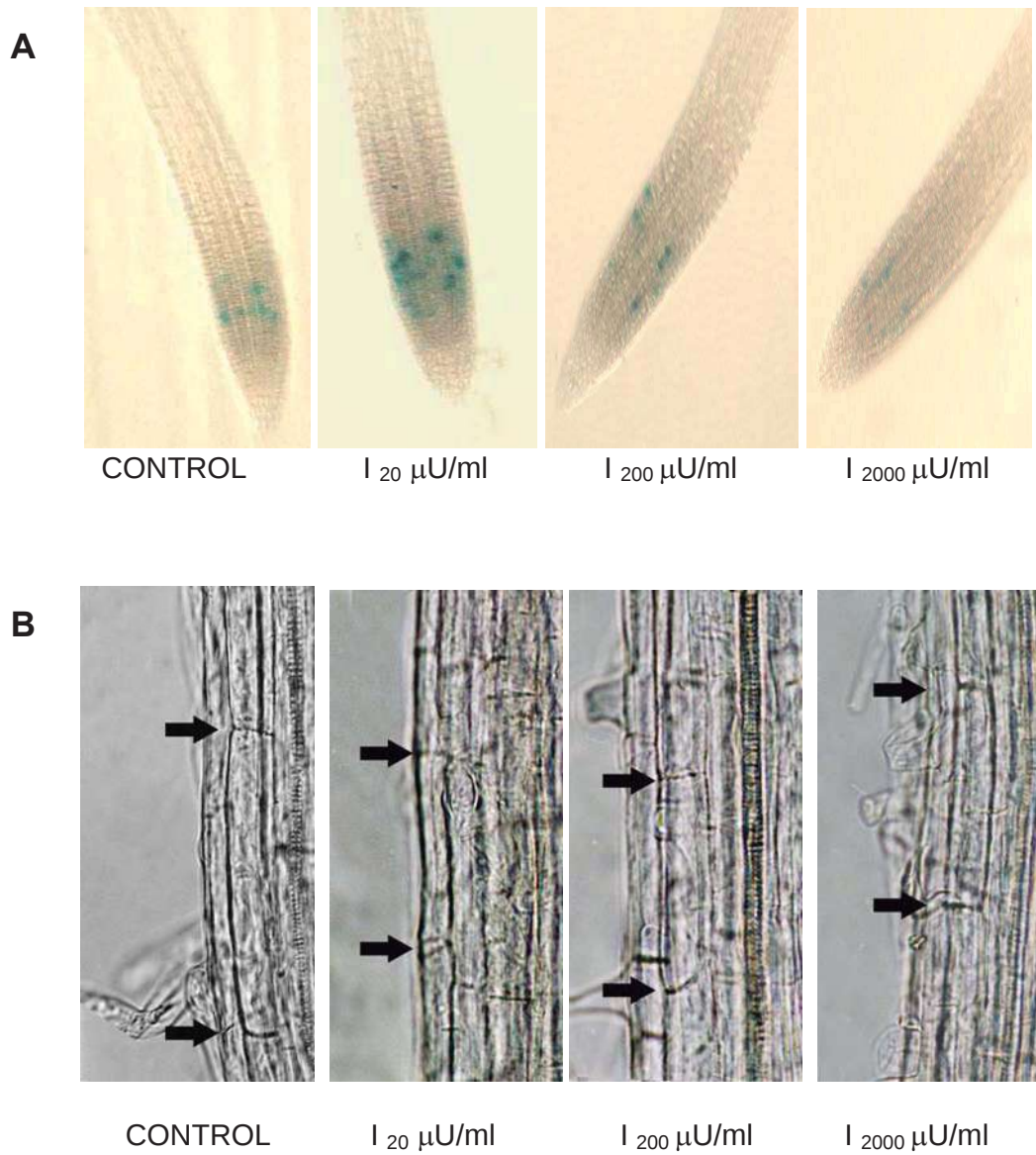


Figura 16. Efecto de insulina sobre la división y elongación celular. A) Plántulas transgénicas Cyc B1: uidA de 9 días teñidas para determinar la actividad de GUS y aclaradas. B) Plántulas Col-0 de 8 días aclaradas para observar el tamaño de las células epidermales. Fotografías representativas de 15 plántulas por cada experimento. Objetivo de 40 X: Plántulas transgénicas Cyc B1:uidA. Objetivo 20X: Plántulas Col-0.

5.6 EFECTO DE INSULINA SOBRE SENSIBILIDAD A AUXINAS

Los efectos observados sobre varios aspectos del desarrollo de la raíz son similares a los descritos por auxinas. Las auxinas tales como el ácido indol acetico producen a bajas concentraciones (10^{-10} – 10^{-9} M) aumentan la longitud de la raíz, y disminuyen los pelos radicales y a altas concentraciones (10^{-8} - 10^{-7} M) presentan inhibición en su raíz principal pero hay un mayor número de raíces laterales (Blakely et al., 1982; Laskowski et al., 1995). Para probar si insulina puede alterar el gen regulador de auxinas realizamos un experimento utilizando plantas transgénicas DR5:uidA (Ulmasov et al., 1997) las cuales son sensibles a auxina. Para ello utilizamos cinco cajas de medio MS 0.2X, 2% de sacarosa por tratamiento sembrando 6 semillas por caja, a los 9 días de sembradas se incubaron con el sustrato de GUS por toda la noche y se aclararon posteriormente. Los resultados obtenidos no mostraron cambios significativos en los tratamientos 20 y 200 μ U/ml, en la concentración de 2000 μ U/ml hay una pequeña disminución en la expresión de auxinas. Estos resultados nos pueden indicar que la insulina a 2000 μ U/ml podría intervenir en el transporte de auxina, lo cual lo confirmaríamos con líneas mutantes resistentes a auxina.

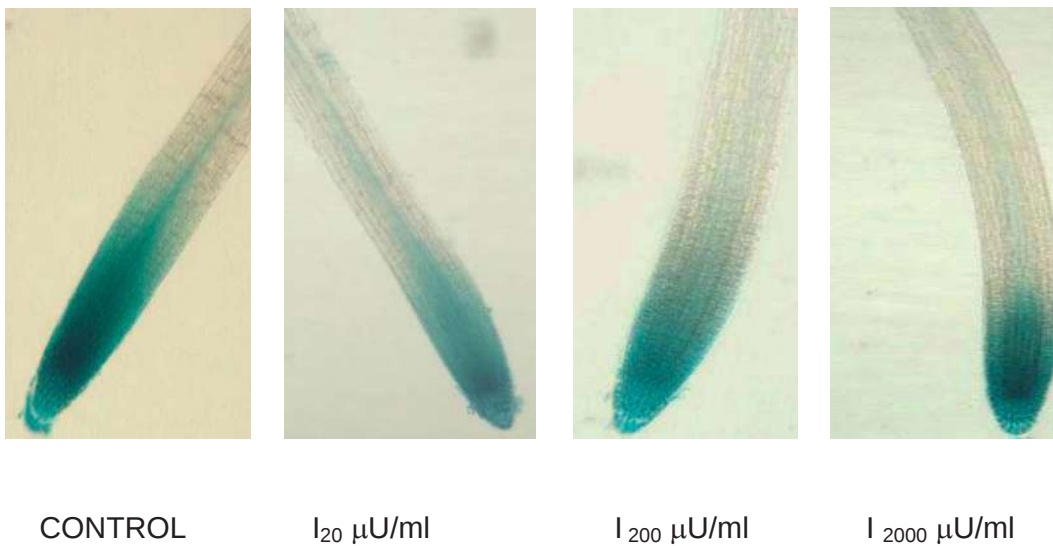


Figura 17. Sensibilidad a auxina. Semillas desinfestadas se sembraron en medio MS 0.2 X, 2% de sacarosa adicionado con insulina: 0, 20, 200 y 2000 $\mu\text{U/m}$, el material se incubó en fotoperiodo. A los 9 días de crecimiento, las plántulas se incubaron en el sustrato de GUS y posteriormente se aclararon. Objetivo 40 X.

VI. DISCUSIÓN

Resultados de varias investigaciones sobre el efecto que ejerce insulina sobre modelos vegetales ha sido ampliamente abordado. Desde 1923 Collip y col. tuvieron el interés de ver los efectos de insulina sobre vegetales tales como las hojas de lechuga y betabeles. Alrededor de 1923 M.M. Ellis y Eyser mostraron resultados de la acción de insulina y glucocinina sobre la germinación de maíz donde referían que altas concentraciones de insulina o glucocinina retardan el crecimiento, mientras que bajas concentraciones son benéficas (Ellis y Eyster, 1923).

Nuestros resultados indican que insulina a una concentración de 20 y 200 $\mu\text{U/ml}$ estimula el crecimiento de la raíz principal de *Arabidopsis*, mientras que las raíces laterales eran más largas y no se presentaban cambios en el número de ellas. En la concentración de 2000 $\mu\text{U/ml}$ se inhibe la longitud de la raíz primaria, en cuanto a las raíces laterales presentaron las siguientes características: mayor longitud y número. Estos datos son semejantes a los reportados por Sánchez de Jiménez y colaboradores donde ellos encontraron que la adición de insulina en maíz (*Zea mays* L. cv. Chalqueño) aceleraba la germinación y crecimiento de plántulas a 200 $\mu\text{U/ml}$ en ejes embrionarios de maíz (Sánchez de Jiménez et al., 1999).

Las raíces laterales se originan de las células del periciclo que es la capa interna de la raíz primaria, al ser estimuladas por auxina. De acuerdo a Zhang y colaboradores ellos mencionan que son cuatro las etapas de formación de raíces laterales (Zhang et al., 1999). La insulina mostró cambios

significativos en las etapas A y D en los diferentes tratamientos, por tal motivo podríamos decir que estimula la formación de nuevos brotes de raíces laterales y que alarga los existentes de la etapa D.

Para determinar si tales efectos eran debidos a elongación o división celular se ensayó en plántulas transgénicas de Cyc B1:uidA donde se observó un incremento de las células mitóticas a la concentración de 20 y 200 $\mu\text{U/ml}$, mientras que hubo una disminución en la concentración de 2000 $\mu\text{U/ml}$, pero al no haber un cambio en la morfología del meristemo radicular, esto solo podría dilucidarse con otro tipo de pruebas para confirmarlo.

En lo que respecta a la elongación celular, nuestros resultados mostraron una disminución en el tamaño de las células epidérmicas en todas las concentraciones de insulina ensayadas (con mayor efecto a la concentración de 20 $\mu\text{U/ml}$). Como mencionamos anteriormente las concentraciones de 20 y 200 $\mu\text{U/ml}$ estimulaban la longitud de la raíz principal y a 2000 $\mu\text{U/ml}$ la inhibían; por lo tanto el efecto de insulina sobre la elongación de células epidérmicas no puede explicar estas diferencias en el crecimiento de la raíz principal.

La auxina es una hormona de plantas que regula el desarrollo de la raíz y la formación de pelos radiculares (Blakely et al., 1982; Laskowski et al., 1995). Por tal motivo se utilizaron plántulas transgénicas DR5:uidA las cuales no mostraron un cambio significativo en 20 y 200 $\mu\text{U/ml}$, pero en 2000 $\mu\text{U/ml}$ hubo una disminución en la concentración de auxinas lo que nos podría indicar

que esta afectando el transporte de auxinas, pero esto se tendría que probar con plantas mutantes resistentes a auxina.

VII. CONCLUSIONES

Bajas concentraciones de insulina (20 y 200 $\mu\text{U/ml}$) estimularon la longitud de la raíz principal, indujeron la formación de nuevos primordios de raíces laterales, alargaron los pelos radiculares, y tuvieron mayor división celular.

A la concentración de 2000 $\mu\text{U/ml}$ inhibieron la longitud de la raíz principal, pelos radiculares y división celular, aumentaron el número y tamaño de las raíces laterales, y disminuyeron la concentración de auxina.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ❖ Abel, S., and A. Theologis. 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111: 9-17.
- ❖ Banting F.G., Best C.H., Collip J.B, Campbell W.R. and Fletcher A.A. 1922. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Preliminary report. *Can. Med. Assoc. J.* 12:141-146.
- ❖ Baum S., Dubrovsky J.F. and Rost T.L. 2002. Apical organization and maturation of the cortex and vascular tissue in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. *Am.F. Bot.* 89:908-20.
- ❖ Beltrán –Peña E.M. 1997. Expresión genética de las proteínas ribosomales durante la germinación del maíz. Tesis de doctorado. UNAM.
- ❖ Berger, D., C. Mussig and T. Altmann. 2000. Plant growth factors and receptors. *Nature Encyclopedia of Life Sciences.* London. <http://www.els.net>.
- ❖ Berleth T. and Chatfield S. 2002. Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell .*The Arabidopsis Book.*
- ❖ Best C.H. and Scott M.A. 1923. Possible sources of insulin. *J. Metabol. Res.* 3:177-179.
- ❖ Blakely L.M, Durham M, Evans T.A. and Blakely R.M. 1982. Experimental studies on lateral root formation in radish seedling roots: general methods, developmental stages, and spontaneous formation of lateral roots. *Bot. Gaz.* 14: 341-352.
- ❖ Bovet L., Muller M.O. and Siegenthaler P.A. 2001. Three distinct lipid kinase activities are present in spinach chloroplast envelope membranes:

Phosphatidylinositol phosphorylation is sensitive to wortmannin and not dependent on chloroplast ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 269-275.

- ❖ Brunn G.J., Williams J. Sabers C., Wiederrecht G., Lawrence Jr. J.C and Abraham R.T. 1996. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J.* 15:5256-5267.
- ❖ Carpi A., Di Maira G., Vedovato M., Rossi V., Naccari T., Floriduz M., Terzi M. and Filippini F. 2002. Comparative proteome bioinformatics: Identification of a whole complement of putative protein tyrosine kinase in the model flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 2: 1494-503.
- ❖ Casson Stuart A. and Lindsey K. 2003. Genes and signaling in root development. *New Phytologist.* 158:11-38.
- ❖ Clowes F.A.L. 1954. The promeristem and the minimal constructional center in grass root apices. *New Physiol.* 53:108-16.
- ❖ Collier E., Watkinson A., Cleland C.F. and Roth J. 1987. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *J. Biol. Chem.* 262: 6238-6247.
- ❖ Collip J.B. 1923. Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. Preliminary paper. *J. Biol. Chem.* 56:513-543.
- ❖ Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T. and Doerner P. 1999. Spatio temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* 20: 503–508.
- ❖ Davies P. J. 1995. The plant hormones: their nature, occurrence and function. In: *Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular*

Biology. P. J. Davies. ed. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers). Pp 1-12.

- ❖ Dietrich R.A., Richberg M.H., Schmidt R., Dean C. and Dangl J.L. 1997. A novel zinc finger protein is encoded by the Arabidopsis LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 88: 685-694.
- ❖ Dinkova TD, Aguilar R. and Sánchez de Jiménez E. 2000. Expression of maize initiation factor eIFiso4E is regulated at translational level. *Biochem. J.* 351: 825-883.
- ❖ Eckardt, N. A. 2001. Auxin and the power of the proteasome in plants. *Plant Cell.* 13: 2161-2163.
- ❖ Ellis M.M. and Eyster W.H. 1923. Some effects of insulin and glucokinin on maize seedlings. *Science.* 58: 541-542.
- ❖ Filho J.X., Oliveira A.E.A., Belarmindo da Silva I., Rocha A. C., Motta V.T., Machado O.L.T., Oliva M.L., Fernandes K.V.S., and Neto J.X. 2003. Plant insulin or glucokinin: a conflicting issue. *Plant Physiol.* 15: 67-78.
- ❖ Finkelstein R. R. and Rock C. D. 2002. Absciscic Acid Biosynthesis and Response. *The Arabidopsis Book.*
- ❖ Flores C.G., Aguilar R., De la Cruz H. R., Albores M. and de Jiménez E.S. 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein síntesis in maize. *Biochem. J.* 358: 95-100.
- ❖ Fumagalli S. and Thomas G. 2000. S6 rp phosphorylation and signal transduction. In: *Translational control of gene expression.* Hershey JWB, Mathews, M.B., Sonenberg, N. (eds) CSHL Press N.Y. pp 695-717.

- ❖ Gallagher, S.R., et al. 1992. GUS Protocols : Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. Academic Press.
- ❖ Garrett H.A., Bruce V. and Maureen R.H. 2005. The Arabidopsis AtRaptor genes are esencial for post-embryonic plant growth. BMC Biology. 3:12.
- ❖ Gingras A.C., Raught B., and Sonenberg N. 2001. Regulation of translational initiation by FRAP/mTOR. Genes Dev. 15: 807-836.
- ❖ Goodman D.B.P. and Davies W.L. 1993. Insulin accelerates the postgerminative development of several fat-storing seeds. Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:440-446.
- ❖ Grierson C. and Schiefelbein J. 2002. Root Hairs. The Arabidopsis Book American Society of Plant Biologists.
- ❖ Guilfoyle, T., G. Hagen, T. Ulmasov and J. Murfett. 1998. How does auxin turn on genes? Plant Physiol. 118:341-347.
- ❖ Hagen, G. and T. Guilfoyle. 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant Mol. Biol. 49: 373-385.
- ❖ Hong, Z. and Verma D.P.S. 1994. A PtdIns 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:9617-9621.
- ❖ Jefferson, R.A., et al. 1987. EMBO J., 6, 3901.
- ❖ Jefferson, R.A. 1989. Nature, 342,837.
- ❖ Kain, S.R., and Ganguly, S. 1996. Uses of Fusion Genes in Mammalian Transfection. Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 1, Suppl. 36, Ausubel, F.M., et al., eds. John Wiley & Sons. p. 9.6.1
- ❖ Karp Gerald. 1998. Biología celular y molecular. Pág. 646 - 648.

- ❖ Kosugi, S., et al. 1990. Plant Science. 70, 133.
- ❖ Laskowski M.J., William M.E., Nusbaum H.C. and Sussex I.M. 1995. Formation of lateral root meristems is a 2-stage process. Development 121: 3303-3310.
- ❖ Liscum, E. and J. W. Reed. 2002. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. Plant Mol. Biol. 49: 387-400.
- ❖ López Bucio J., Cruz Ramírez A., Pérez Torres A., Ramírez Pimentel J.G., Sánchez Calderón L., and Herrera Estrella L. 2004. Root architecture.
- ❖ Malamy J.E. and Benfey P.N. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. 124:33-44
- ❖ Manning B.D. and Cantley L.C. 2003. Rheb fills a GAP between TSC and TOR. Trends Biochem. Sci. 28:573-576.
- ❖ Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C. and Robaglia C. 2002. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:6422-6427.
- ❖ Meyuhas O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. Eur. J. Biochem. 267. 6321-6330.
- ❖ Montiel, G., Pascal G., Allemand C. J., and Breton C. 2004. Transcription Factor Networks. Pathways to the Knowledge of Root Development. Plant Physiology 136: 3478-3485.
- ❖ Morimoto M. S. 2000. Mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de la síntesis de insulina por glucosa. Rev. Hosp. Gral Dr. M Gea González. Vol 3, No. 3 Págs. 118-120.

- ❖ Nemhauser J., and Chory J. 2002. Photomorphogenesis. The Arabidopsis Book.
- ❖ Oliveira A.E.A., Machado O.L.T., Gomes V.M., Xavier-Neto J. Pereira A.C., Vieyra J.G.H., Fernandes K.V.S. and Xavier-Filho J. 1999. Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. Protein Pept. Lett. 6:15-21.
- ❖ Olson A.L. and Pessin J.E. 1996. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. Annu Rev Nutr. 16:235-236.
- ❖ Pessin J. and Saltiel A.R. 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. J Clin Invest. 106:165-169.
- ❖ Ramírez Chávez E., López-Bucio J., Herrera-Estrella L. and Molina-Torres. 2004. Alkamides Isolated from Plants Promote Growth and Alter Root Development in Arabidopsis. Plant Physiology. 134: 1058-1068.
- ❖ Reyes de la Cruz H, Aguilar R and Sánchez de Jiménez E. 2004. Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70S6K. Biochemistry 43: 533-539.
- ❖ Richardson C.J., Schalm S.S and Blenis J. 2004. PI3-kinase and TOR: PIKTORing cell growth. ELSEVIER. 147-159.
- ❖ Sánchez de Jimenez E., Beltrán-Peña E. and Ortiz-López A. 1999. Insulin stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. Physiol. Plant. 105:148-154.
- ❖ Santos V.O. 2003. Presença de insulina em phaseolus vulgaris L. cv. Carioca. Monograph, Universidade Estadual Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.

- ❖ Scheres B., Benfey P. and Dolan L. 2002. Root Development. The Arabidopsis Book. 1-18.
- ❖ Scheres B. and Wolkenfelt. 1998. The Arabidopsis root as a model to study plant development. Plant Physiol. 36 (1-2), 21-32.
- ❖ Tiwari, S. B., G. Hagen and T. Guilfoyle. 2003. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. Plant Cell 15: 533-543.
- ❖ Ulmasov T, Murfett J, Hagen G. and Guilfoyle T. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. Plant Cell 9: 1963–1971.
- ❖ Virkamäki A., Ueki K. and Kahn C.R. 1999. Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation. Vol. 103: 931-943
- ❖ Wilson Z.A. 2000. Arabidopsis. Editorial Oxford University Press.. USA. 1-4pp.
- ❖ White M.F. 2007. Insulin signaling Pathway. Sci. STKE (Connections Map in the Database of Cell Signaling, as seen 23 January 2007). http://stke.sciencemag.org/cgi7cm7stkecm;CMP_12069.
- ❖ Zhang H., Jennings A., Barlow P.W. and Forde B.G. 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. Proc Natl Acad Sci USA 96: 6529-6534.